

10/019394

PCT/JP01/02772

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

30.03.01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

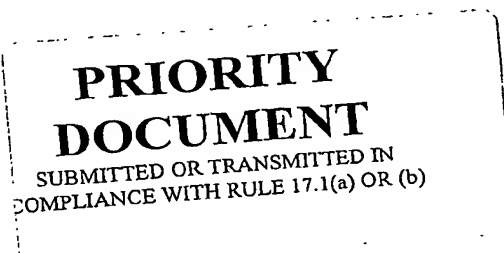
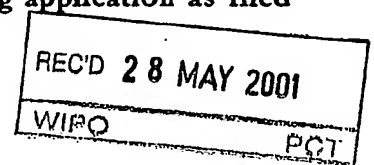
2000年 3月31日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-098293

出 願 人
Applicant(s):

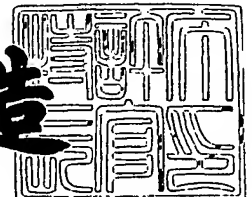
株式会社北海道グリーン興産
佐々木 康晴



2001年 5月11日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



特 2 0 0 0 - 0 9 8 2 9 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 1406P2000

【提出日】 平成12年 3月31日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 C12N 3/00

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北1条西19丁目2番地 ファミール第2大通り802号

 【氏名】 佐々木 進

【発明者】

 【住所又は居所】 北海道札幌市中央区大通西18丁目1番地3 オリムピア大通西18丁目マンション702号

 【氏名】 佐々木 康晴

【特許出願人】

 【識別番号】 392001461

 【氏名又は名称】 株式会社北海道グリーン興産

【特許出願人】

 【識別番号】 398023782

 【氏名又は名称】 佐々木 康晴

【代理人】

 【識別番号】 100059281

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 鈴木 正次

 【電話番号】 03-3353-3407

 【連絡先】 FAX 03-3359-8340

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 011589

 【納付金額】 21,000円

特 2 0 0 0 — 0 9 8 2 9 3

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9200590

【包括委任状番号】 9806459

【プルーフの要否】 要

特 2 0 0 0 - 0 9 8 2 9 3

【書類名】 明細書

【発明の名称】 厚膜孢子及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 トリコデルマ ハルジアナム SK-55 の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、培養して得たことを特徴とする厚膜孢子。

【請求項 2】 培養培地は、グルコース 2.0%～3.0%（質量）、酵母エキス 0.3%（質量）、ポリペプトン 0.3%（質量）、硫酸マグネシウム 0.05%（質量）、塩化カルシウム 0.05%（質量）及び消泡剤 0.001%（質量）としたことを特徴とする請求項 1 記載の厚膜孢子。

【請求項 3】 トリコデルマ ハルジアナム SK-55 の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、適温に保ちつつ通気と攪拌を継続して菌糸体の増殖を図り、ついで攪拌強度を高めて孢子形成を促進させつつ、通気培養を継続させた後、前記培養液と生成した菌糸体、分生子及び厚膜孢子とを分離することを特徴とした厚膜孢子的製造方法。

【請求項 4】 適温は 27℃～29℃とし、通気量は 0.3 v v m とし、攪拌数は 100～200 r p m とし、接種種量は 0.7% とすることを特徴とした請求項 3 記載の厚膜孢子的製造方法。

【請求項 5】 培地内のグルコース消費後（培養 2 日後）攪拌数を 15～30% 増加すると共に通気培養を継続することを特徴とした請求項 3 記載の厚膜孢子的製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55（平成 4 年 12 月 9 日付で工業技術院微生物工業技術研究所へ受託。受託番号 微工研菌寄第 13327 号）の厚膜孢子又は菌糸体、分生子及び厚膜孢子的混合物を多量生産することを目的とした厚膜孢子及びその製造方法に関する。

【0002】

特 2 0 0 0 - 0 9 8 2 9 3

【従来の技術】

従来菌糸体微生物には、微量の厚膜胞子が含まれていることが知られていた。前記厚膜胞子は、環境対応性が高く、低温はもとより、高温においても死滅しないことが知られていた。またニンピア スシルピコラ K-004 (FERM B p-4448) の厚膜胞子及びその誘導培地に関する発明の提案がある (特開平 7-303481号)。

【0003】

【発明により解決しようとする課題】

前記に示した天然に存在する厚膜胞子は、極めて微量である為に、これを集めて使用することは困難である。また前記公知発明に示された培地では、一般的菌糸体微生物の厚膜胞子を効率よく多量生産することはむづかしい問題点があった。

【0004】

【課題を解決するための手段】

この発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55 (*Trichoderma harzianum* SK-55) を通常培養により培養させると共に、厚膜胞子生成条件を付与することにより、多量の厚膜胞子の生成に成功したのである。

【0005】

即ちトリコデルマ ハルジアナム SK-55 の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、培養して得たことを特徴とする厚膜胞子であり、培養培地は、グルコース 2.0%~3.0% (質量)、酵母エキス 0.3% (質量)、ポリペプトン 0.3% (質量)、硫酸マグネシウム 0.05% (質量)、塩化カルシウム 0.05% (質量) 及び消泡剤 0.001% (質量) としたものである。

【0006】

次に方法の発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55 の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、適温に保ちつつ通気と攪拌を継続して菌糸体の増殖を図り、ついで攪拌強度を高めて胞子形成を促進させつつ、通気培養を継続させた後、前記培養液と生成した菌糸体、分生

子及び厚膜孢子とを分離することを特徴とした厚膜孢子の製造方法である。また適温は27℃～29℃とし、通気量は0.3vvmとし、攪拌数は100～200rpmとし、接種種量は0.7%とするものであり、培地内のグルコース消費後（培養2日後）攪拌数を15～30%増加すると共に通気培養を継続するものである。

【0007】

前記発明における培地はpH調整していなくても、菌糸体の増殖に支障はない。

【0008】

前記発明において、培養温度を27℃～29℃にしたのは、トリコデルマ ハルジアナム SK-55の菌糸体（以下SK-55という）の増殖適温だからである。

【0009】

前記発明において培地から菌糸体及び厚膜孢子を回収するには、通常菌糸体の分離に使用されている遠心分離機又は圧搾濾過法を使用する。

【0010】

この発明において、培養後2日後位から攪拌数（振盪数）を早くするのは、菌糸体の増殖について困難性を増し、厚膜孢子の生成を促進させる為である。主としてグルコースを消費尽した頃（2日後）攪拌数を増加させれば、SK-55の菌糸体が自衛上厚膜孢子化すると判断した為であるが、実際上もそのようになって厚膜孢子の生成が促進された。

【0011】

前記発明における通気量は、培地容量が100ミリリットルについて0.3vvmであって、容量が多くなれば、当然通気量も大きくなる。

【0012】

【発明の実施の形態】

この発明は、SK-55の菌糸体を椎茸等の培地と近似した培地に接種し、通気攪拌して培養すると共に、栄養分消費時に外部刺激を強くして厚膜孢子化を促進させた後、遠心分離法その他の手段によって培地と、菌糸体、分生子及び厚膜

孢子とを分離することを特徴とした厚膜孢子及びその製造方法である。

【 0 0 1 3 】

前記椎茸等の培地とは、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを主材料とし、これに必要な微量成分（例えば硫酸マグネシウム、塩化カルシウム）であって、この場合に p H は無調整である。

【 0 0 1 4 】

前記培養において、温度は 2 7 ℃ ～ 2 9 ℃、通気量は 0 . 3 v v m、攪拌数は 1 0 0 ～ 2 0 0 r p m、接種種量は 0 . 5 ～ 0 . 8 % であって、p H 調整はしていない。

【 0 0 1 5 】

【実施例】

この発明の実施例を説明する。

【 0 0 1 6 】

(1) 種培養

(培地組成)

グルコース	2 2 . 0 (g / L)
酵母エキス	3 . 0 (g / L)
ポリペプトン	3 . 0 (g / L)
M g S O ₄	0 . 5 (g / L)
C a C l ₂	0 . 5 (g / L)
p H	無調整

【 0 0 1 7 】

前記成分 1 0 0 ミリリットルを容量 2 0 0 ミリリットルの三角フラスコに入れ、S K - 5 5 を 3 g / L の割合で接種し、2 8 ℃ で 7 日間、通気量 0 . 3 v v m、1 0 0 r p m の振盪培養した。

【 0 0 1 8 】

(2) 主培養

(培地組成)

グルコース	3 3 . 0 (g / L)
-------	-------------------

特 2000-098293

酵母エキス	3.0 (g/L)
ポリペプトン	3.0 (g/L)
MgSO ₄	0.5 (g/L)
CaCl ₂	0.5 (g/L)
消泡剤	0.1 (g/L)
pH	無調整

【0019】

前記成分15リットルを、容量30リットルのジャーに入れた培地内へ、前記(1)で得た種培養液100ミリリットルを収容し、温度28℃、通気量0.3vvm、200rpmの振盪培養した。前記培地内のグルコース消費後(培養2日後)、240rpm振盪して孢子形成を促進させ、更に5日間通気培養を継続した。前記のようにして、7日間培養後、培養液を遠心分離機で菌糸体、分生子及び厚膜孢子を分離した。

【0020】

前記分離物に乾燥助材(珪藻土、ゼオライトなど)を20~30%添加し、30~40℃の減圧乾燥機に入れて攪拌しつつ水分6~12%に乾燥して菌糸体、分生子及び厚膜孢子の混合製品を得た。

【0021】

前記混合物をホモゲナイザー無菌的に、菌糸体を破碎処理し、50~60℃で風乾すれば乾燥製剤ができる。

【0022】

前記の他、混合物から遠心分離その他の方法により厚膜孢子を分離し、別製に分生子を任意の割合で加入すれば、厚膜孢子と、分生子の割合を使用目的別に規制し、植物別、使用場所別の製剤とすることができる。

【0023】

前記分離した分生子は 1.7×10^7 (CFU/ml)であり、厚膜孢子は 1.2×10^7 (CFU/ml)であった。

【0024】

前記実施例におけるグルコースの消費状態は図1の通りである。

特 2 0 0 0 — 0 9 8 2 9 3

【 0 0 2 5 】

前記で得た製品中の厚膜胞子は熱耐性が大きく、例えば -5°C ～ $+70^{\circ}\text{C}$ 位までは保存中に破壊されるおそれがない。また分生子と、厚膜胞子とを混合して包装すれば、分生子の熱耐性を向上し得ると共に、厚膜胞子の発芽率を向上することが認められた。

【 0 0 2 6 】

(試験例) SK-55の土壤病害に対する評価試験

供試菌 ダイコンバーディシリウム黒后病 *verticillium dahliae*

供試植物 20日大根

供試薬剤 SK-55分生子製剤、同厚膜胞子製剤、同分生子原抹

対照剤 ベンレート (住友化学工業株式会社製)

病原土壌 北海道の汚染土壌 (北海道グリーン興産提供)

接種発病方法

250mlカップ (アンミツカップ) に滅菌土150ml入れ、その上に病原土壌50mlを詰め、試験薬剤を夫々所定量を均一にばらまき (対照剤は所定量を灌注処理した)、3日後、種子を1カップ当り10粒播種した。その後8メッシュでふるった滅菌土で覆土し、普通灌水し栽培した。

【 0 0 2 7 】

調査方法

調査は、覆土に近い位置でダイコンの葉茎を切り取り、維管束部分の褐変—黒変化を調査して発病菌率を調べた。

【 0 0 2 8 】

試験は3区反復して実施した。その結果は表1の通りである。

【 0 0 2 9 】

【表 1】

表 1 評 価

項 目 供試剤	処理量	発病菌率 (%)	防除効果 (%)
SK-55 分生子製剤	10 g/m ²	53.0	27
	30 g/m ²	61.5	14
	100 g/m ²	22.2	69
SK-55 厚膜胞子製剤	10 g/m ²	60.9	15
	30 g/m ²	52.4	27
	100 g/m ²	8.8	88
SK-55 分生子原抹	10 g/m ²	59.9	17
	30 g/m ²	21.7	70
	100 g/m ²	4.2	94
ベンレート		23.8	69
無処理		71.4	

【0030】

試験日：菌接種、薬剤処理 99・11・19、播種 11・22、

調査 00・1・11

結 果：無処理区の発病は高かった。分生子製剤、厚膜胞子製剤では、使用量 10 g/m² と、30 g/m² での効果は確認できなかったが、100 g/m² では対照剤ベンレートと同等の活性が認められた。

【0031】

更に分生子原抹では、菌量が多いので 30 g/m²、100 g/m² で顕著な防除効果が認められた。

【0032】

【発明の効果】

この発明によれば、熱耐性が優れかつ均質の SK-55 の厚膜胞子を多量に得ることができる。

【0033】

この発明の方法によれば、SK-55 の厚膜胞子を多量生産できる効果がある。

【図面の簡単な説明】

特 2 0 0 0 - 0 9 8 2 9 3

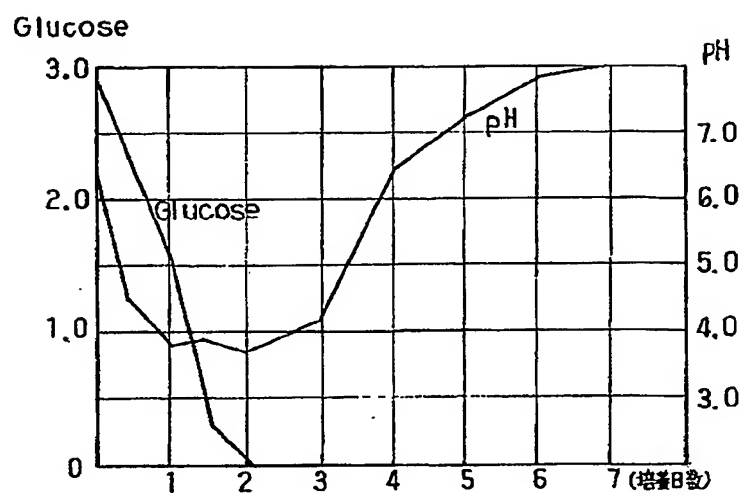
【図 1】

この発明の実施例の培養時におけるグルコースと日数のグラフ。

特2000-098293

【書類名】 図面

【図1】



特 2 0 0 0 - 0 9 8 2 9 3

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 この発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55 の菌糸体の厚膜胞子を目的としたものである。

【解決手段】 この発明は、トリコデルマ ハルジアナム SK-55 の菌糸体を、グルコース、酵母エキス及びポリペプトンを含む培養培地に接種し、培養して得たことを特徴とする厚膜胞子によりその目的を達成した。

【選択図】 図 1

特 2 0 0 0 - 0 9 8 2 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 2 0 0 1 4 6 1]

1. 変更年月日 1 9 9 1 年 1 2 月 2 0 日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市中央区北 1 条西 1 8 丁目 1 番地
氏 名 株式会社北海道グリーン興産

特 2 0 0 0 - 0 9 8 2 9 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 8 0 2 3 7 8 2]

1. 変更年月日 1 9 9 8 年 3 月 2 0 日

[変更理由] 新規登録

住 所 札幌市中央区大通西 1 8 丁目 1 番地 3 オリンピア大通西 1 8
丁目マンション 7 0 2 号

氏 名 佐々木 康晴